

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-180878

(43)Date of publication of application : 06.07.1999

(51)Int.Cl.

A61K 35/36
A61K 7/06

(21)Application number : 09-364545

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 17.12.1997

(72)Inventor : ISHIBASHI TAKUYA
KAWAMURA YOSHIHISA
TEJIMA SHINICHI

(54) TRICHOGENOUS INDUCER AND TRICHOGENIC METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a trichogenous inducer that can induce the hair growth on the site of the head skin, alopecic or thin head by using hair papilla cell spheroid.

SOLUTION: Preferably, human originating trichogenous cells, home made or homocytic hair papilla cells are cultured, and the obtained hair papilla cell spheroid is used to prepare the objective trichogenous inducer. This spheroid is transplanted to skin to induce the hair growth. The hair plantation is preferably carried out at preliminarily bored holes.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.08.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-180878

(43)公開日 平成11年(1999)7月6日

(51)Int.Cl.⁴

A 6 1 K 35/36
7/06

識別記号

A D T

F I

A 6 1 K 35/36
7/06

A D T

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平9-364545

(22)出願日 平成9年(1997)12月17日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 石橋 卓也

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 手嶋 真一

大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 東洋紡
績株式会社内

(74)代理人 弁理士 高島 一

(54)【発明の名称】 発毛誘導剤および発毛方法

(57)【要約】

【課題】 ドナーおよび採取部位の肉体的苦痛を最小限にとどめ、移植に必要な毛乳頭細胞を確保し、皮膚に適切な発毛を誘導する。

【解決手段】 毛乳頭細胞スフェロイドを含有する発毛誘導剤。皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイド。毛乳頭細胞培養用培地、培養容器およびスフェロイド培養器を含有する皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイド作成用キットおよび毛乳頭細胞を培養しスフェロイドを形成させ、そのスフェロイドを皮膚に移植することを特徴とする、該部位に発毛を惹起させる方法。

【効果】 採取部位の肉体的苦痛を最小限にとどめ、多面積の皮膚における発毛処置が可能になる。また、自家移植が容易になり、免疫学的拒絶反応の危険性を回避し、ウイルスをはじめとする病原性微生物の感染の危険性を回避できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 毛乳頭細胞スフェロイドを含有する発毛誘導剤。

【請求項2】 毛乳頭細胞スフェロイドが毛乳頭細胞を培養して得るものである請求項1記載の発毛誘導剤。

【請求項3】 毛乳頭細胞スフェロイドを皮膚に移植することを特徴とする請求項1記載の発毛誘導剤。

【請求項4】 皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイド。

【請求項5】 毛乳頭細胞培養用培地、培養容器およびスフェロイド培養器を含有する皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイド作製用キット。

【請求項6】 毛乳頭細胞を培養しスフェロイドを形成させ、そのスフェロイドを皮膚に移植することを特徴とする、該部位に発毛を惹起させる方法。

【請求項7】 毛乳頭細胞がヒト起源毛乳頭細胞である請求項6記載の方法。

【請求項8】 毛乳頭細胞が自家又は同種細胞である請求項6記載の方法。

【請求項9】 移植をあらかじめ穿孔された孔に行うことを特徴とする請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、皮膚への発毛誘導剤の移植に関する。詳しくは、頭部皮膚および薄毛または脱毛部位に発毛を促す毛乳頭細胞スフェロイドを移植することによる該部位の発毛誘導に関する。

【0002】

【従来の技術】毛髪移植は、広く実施されている処理である。典型的には、多くの個別移植片を埋植するものである。通常、外科的手術で毛根、毛包等を切除し毛髪移植片を準備する。この移植片は、頭皮にあらかじめ処理された直径0.2～1.4mmの穿孔部位に移植される(特開平8-224253)。

【0003】このような実際の器官移植法に平行して、治療的移植目的ではない、毛機能研究モデル開発目的において、機能を持つ組織あるいは細胞に特化して、移植片についての研究がなされている。近年、当該技術分野で、毛髪の成長は周期的であり、成長期、退行期、休止期によって毛周期が形成されていることが言われている。発毛に重要と考えられているのは、新たな毛包が形成されるステージである休止期から成長期にあるとされており、このステージにおいて重要な働きをする毛組織は、毛乳頭であると考えられている。毛乳頭細胞は、毛母細胞などの周りの上皮系の細胞へ信号を送り、毛髪および毛包全体を形成させる重要な役割を担っていると考えられている。これらに関連する他の研究成果としては、例えばJahodaら(Nature 311, 560-562(1984))は、下半分が除去された毛包底にラット髭培養毛乳頭細胞を移植すると、この移植毛乳頭細胞の周囲に真皮性マトリックスを有する毛球が形成されることを明らかにしてい

る。Reynoldsら(Development 115, 587-593(1992))は、ラットの毛乳頭細胞が、フットパッド表皮に新たに毛包を誘導することを示している。また、ヒトにおいては、ヒト毛乳頭細胞のスフェロイドをラットのフットパッドに挿入し、そのフットパッド片をヌードマウスの腎臓とその皮膜との間に移植させることにより、ヒト毛乳頭細胞からの毛包誘導を生じることが示されている(特開平9-140377)。

【0004】外科的手術で頭部皮膚に移植を行い、当該部位を多毛化させるためには、ドナー部位より多量の移植片を採取する必要がある、大面積にわたり移植片の外科的手術が必要である。この多量採取により被移植片採取部位の異常が起こりやすい。

【0005】さらに、ヒトへ移植片を移植する場合、免疫学的拒絶反応の危険性、ウイルスをはじめとする病原性微生物の感染の危険性の問題がある。これらの問題を回避するため、または最小限にとどめるために自家移植が適することがよく知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、ドナーおよび採取部位の肉体的苦痛を最小限にとどめ、移植に必要な毛乳頭細胞を確保し、皮膚に適切な発毛を誘導すること、および、免疫学的拒絶反応の危険性、ウイルスをはじめとする病原性微生物の感染の危険性の問題を回避、または最小限にとどめて頭部皮膚に適切な発毛を誘導することを検討した。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、毛乳頭細胞を拡大培養し、該細胞をスフェロイド化することにより生体の毛乳頭構造と近似させ、移植することにより、ドナーおよび採取部位に負担を強いることなく多面積の移植を可能にし、発毛を誘導できることを見出し本発明を完成した。

【0008】本発明は、毛乳頭細胞スフェロイドを含有する発毛誘導剤に関する。また、皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイドに関する。さらに、毛乳頭細胞培養用培地、培養容器およびスフェロイド培養器を含有する皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイド作製用キットに関する。さらに、毛乳頭細胞を培養しスフェロイドを形成させ、そのスフェロイドを皮膚に移植することを特徴とする、該部位に発毛を惹起させる方法に関する。すなわち、本発明は、移植に必要な毛乳頭細胞を確保し、その細胞を3次元再構築させ移植することによる発毛誘導に関する。

【0009】本発明で用いられる毛乳頭細胞は、動物、好ましくはヒトの皮膚から得ることができる。特に好ましいのは、自家または同種細胞である。皮膚はどこの皮膚でもよいが、特に、頭皮の側頭部又は後頭部が好ましい。外科的手術により、数個の毛根部を切除する。毛根部を例えば、ゲンタマイシン等の抗生物質を含むリン酸

緩衝生理食塩水（PBS）等で洗浄した後、顕微鏡下、物理的手段たとえばピンセットで、毛球部を単離する。この毛球部下部から毛乳頭を露出させて毛乳頭を単離する。

【0010】こうして得られた毛乳頭の培養は、毛乳頭を鋭い刃物等で細かくした後、動物細胞の培養に用いられる栄養培地中、培養皿を用いて静置培養を行う。

【0011】毛乳頭細胞の培養に用いる培地は、通常動物細胞培養に供するものであればよい。代表的な培地としては、牛胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM培地）、チャンの培地（Chang's medium）、パピラ細胞培養培地（東洋紡社製）が挙げられる。

【0012】必要に応じて、培地には添加剤を加えることができる。細胞増殖因子、ホルモン、微量元素などを加え培養することが出来る。これらの具体的なものとしてトランスフェリン、インスリン、トリヨードタイロニン、グルカゴン、繊維芽細胞増殖因子、ハイドロコチゾン、テストステロン、牛脳下垂体抽出液、表皮細胞抽出液、表皮細胞培養上清、プロジェステロン、セレンなどが挙げられる。

【0013】本発明で用いられる培養容器は、通常動物細胞培養に供するものであればよい。好ましくは、光学的に透明なポリスチレン製で細胞の付着や成長に必要な表面処理がなされている細胞培養フラスコあるいは培養皿がよい。また、コラーゲン、フィブロネクチン等の細胞外マトリックスでコート処理されているものがよい。特に好ましい培養容器としては、コラーゲンタイプIがコートされた培養容器で、市販品としては、セルタイトC-1（住友ベークライト製）等が挙げられる。

【0014】本発明の毛乳頭細胞スフェロイドは球状の細胞集合体であり、通常の単層培養細胞とは異なり、生体と類似した構造、機能を保持している。本発明の毛乳頭細胞スフェロイドは毛乳頭細胞から得られる。毛乳頭からアウトグロースしてきた毛乳頭細胞を継代培養し、細胞を増殖させて得た毛乳頭細胞を培養皿から剥離させ、細胞懸濁液を得る。その細胞懸濁液をスフェロイド培養器に $10^2 \sim 10^6$ 個/穴の割合、好ましくは $10^3 \sim 10^5$ 個/穴で播種し、培養を2～10日間、好ましくは3～5日間培養することにより、球状の細胞集合体であるスフェロイドが得られる。培養温度は、 37°C が好ましい。2～10%好ましくは5～10%の二酸化炭素存在下で培養する。本発明のスフェロイドの大きさは、直径、 $50\mu\text{m} \sim 500\mu\text{m}$ 、好ましくは $100\mu\text{m} \sim 300\mu\text{m}$ である。

【0015】本発明で用いられるスフェロイド培養器は、スフェロイドを均質に作製することの出来るスフェロイド培養器であればよい。代表的なスフェロイド培養器としては、スフェロイド培養用96穴プレート（住友ベークライト社製）が挙げられる。

【0016】本発明の発毛誘導剤は、毛乳頭細胞スフェ

ロイドを含む。発毛誘導剤の形態は、毛乳頭スフェロイド自体でもよいし、溶液にスフェロイドを懸濁した形態でもよい。懸濁する溶液は、生理食塩水、PBS等が挙げられる。このとき、ゼラチン、抗生剤、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、肝細胞増殖因子（HGF）等を含んでいてもよい。

【0017】本発明の発毛誘導剤は、皮膚表皮層剥離面やレーザーを用い頭皮に穿孔した孔あるいはトランスヘアーマイクロドリルで穿孔した孔に移植される。発毛誘導剤が毛乳頭細胞スフェロイド自体のときは、マイクロピンセット等を用いて移植できる。また、発毛誘導剤が溶液のときは、注射針を用いて皮内注射し移植できる。

【0018】本発明の発毛誘導剤は、移植必要部位 1cm^2 あたり、10～100個移植する。好ましくは25～80個移植する。

【0019】本発明の毛乳頭細胞スフェロイド作製用キットは、毛乳頭細胞培養用培地、培養容器およびスフェロイド培養器を含有する。培養容器は細胞培養フラスコあるいは培養皿がよい。複数の、好ましくは2～5の培養容器がキットに含まれる。また、必要に応じて複数のスフェロイド培養器を含有する。すべて滅菌済であるのが好ましい。また、すぐ使用出来るように、培地は小分けされているのが好ましい。

【0020】

【実施例】以下、実施例及び実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0021】実施例1 発毛誘導剤（皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイド）の作製

実体顕微鏡下でヒト頭部毛包より毛乳頭を分離し、コラーゲンでコート処理した35mmプラスチックシャーレ（コースター社製）を用い、10%牛血清含有DMEM培地にて毛乳頭細胞の分離培養を行った。細胞がコンフレントに達したところで継代し、7～8継代目のものについて、同培地にて細胞を回収し、毛乳頭細胞懸濁液を得た。毛乳頭細胞懸濁液をスフェロイド培養用96穴プレート（住友ベークライト社製）に細胞が $0.5 \sim 2 \times 10^4$ 個/穴になるよう播種し、 37°C 、5% CO_2 下で3～5日培養し、皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイドを得た。このスフェロイドを小試験管に集め、生理食塩水で5回洗浄操作を行い発毛誘導剤を得た。

【0022】実施例2

実施例1で得られた皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイドをPBSに懸濁し、注射剤として供することのできる液状の発毛誘導剤を得た。

【0023】実施例3 皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイドのマウスへの移植

移植する動物は8週齢のヌードマウス（雄）を日本クレアから購入し用いた。まず、ヌードマウス背部を髭剃り用シェーバーで剃毛したのち、イソジン（明治製薬株式

会社製)を用いて消毒を施した。次に、18Gの注射針(テルモ社製)を用いてヌードマウス背部皮膚の真皮部に到る穿孔を行った。その後、各孔に実施例1で作製した皮膚移植用毛乳頭細胞スフェロイドをマイクロピンセット及び先端の平坦なブローチを用いて埋め込んだ。その後、各孔は、皮膚上皮部の接着を促すためにも、皮膚表面に少量の接着液(アロンアルファ)をつけることで、一時的に切創部を閉塞させた。その上をバンドエイド及び包帯で覆い、2週間放置し、傷口が治癒したところで、これら覆いを除去して飼育した。発毛は、経日的に肉眼観察した。60~70日後にヌードマウスの移植背部に発毛が観察された。

【0024】実施例4

ヒト疑似皮膚である培養人工皮膚三次元モデルへの皮膚移植用毛乳頭細胞のスフェロイドの移植

1. 生きた人工皮膚組織の作製

コラーゲンゲル作製方法は、ベルらの方法(Bell, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1274-1979)に準じて行った。オルガノジェネシス社から購入したヒト繊維芽細胞を10%牛血清含有DMEM培地にて培養し、サブコンプレントに達した後、同培地にて細胞を回収し、繊維芽細胞懸濁液を得た。4℃において、9容量のコラーゲン溶液(オルガノジェネシス社製)に1容量の10倍濃度のEMEM培地(ギブコ社製)を加え、重曹をpHが中性付近になるまで攪拌しながら加えた。さらに10%量の牛血清を加えた後、上記繊維芽細胞懸濁液を、最終細胞濃度が 2.5×10^4 個/mlになるようゆっくり加え、よく攪拌した。かかる混合溶液を6穴プレートに入れたトランスウェル(コースター社製)の内側に3mlずつ加え、室温にて15分間静置し、ゲル化させた。かかるコラーゲンゲルに10%牛血清含有DMEM培地を静かに添加し、37℃、10%CO₂ 下で5~7日間培養し、繊維芽細胞の作用によってコラーゲンゲルを収縮させた後、人工皮膚の支持体に供した。次に、表皮角化細胞の播種、培養はベルらの方法(Parenteau, N.L., et al., J. Cellular Biochem., 45, 245-1991)に従って行った。すなわち、オルガノジェネシス社から購入したヒト表皮角化細胞をCa不含DMEM:HAM F12=3:1を基礎とするEpidemalization 用培地(東洋紡社製)に懸濁し、コラーゲンゲルの上に同細胞懸濁液を、細胞が $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 個/cm² になるように添加した。次いで、同培地を静かに添加し、37℃、10%CO₂ 下で3~5日間培養し、表皮角化細胞を充分伸展させた。次に、Ca不含DMEM:HAM F12=1:1を基礎とするMaintenance 用培地(東洋紡社製)を、真皮層が培養液下で、かつ表皮角化細胞が空気中に出よう添加し、37℃、10%CO₂ 下で7~10日間培養し、生きた人工皮膚組織を作製した。

【0025】2. 毛乳頭細胞スフェロイドの人工皮膚への移植

作製した人工皮膚モデルの表皮表面に18Gの注射針(テルモ社製)を用いて、穿孔を作製した。その孔に、実施例1と同様に作製した毛乳頭細胞スフェロイドを1個ずつ埋め込んだ。Epidemalization 用培地(東洋紡社製)を用いて2日培養後、Maintenance 用培地(東洋紡社製)に換え培養をさらに7日間継続した。

【0026】3. 皮膚付属器官様構造体の確認

以上のようにして得られた毛乳頭細胞を組み込んだ人工皮膚をホルマリン固定し、切片作製後、HE染色を行った。得られた組織切片像を図1および図2に示す。ここに示すように、作成された人工皮膚はヒト皮膚に非常によく似た形態を示しており、組み込まれた毛乳頭スフェロイドは、毛包状の皮膚付属器官様構造体として、表皮/真皮境界部の適当な位置に組み込まれていることが見られた。さらに、組み込み後、培養を継続すると毛乳頭細胞スフェロイドの上部の表皮層部に毛幹様の角化した領域が見られ、組み込んだ毛乳頭スフェロイドによる発毛惹起が確認された。

【0027】実施例5 毛乳頭細胞スフェロイド作製用キットの作成

実施例1で検討された培養方法に従い毛乳頭細胞スフェロイド作製用キットを作成した。キット構成としては、分離培養セット、継代培養セット、スフェロイド培養セットの3群より構成した。各セットの構成は、分離培養セットが、コラーゲンタイプIをコートした培養皿、毛乳頭培養培地よりなり、継代培養セットが、コラーゲンタイプIをコートした細胞培養用フラスコおよび毛乳頭培養培地よりなり、スフェロイド培養セットが、スフェロイド培養用96穴プレート(住友ベークライト製)および毛乳頭スフェロイド培養培地よりなるように設定した。各セット共通試薬として継代培養用試薬セット(PBS、トリプシン-EDTA液、トリプシン中和液)を構成させた。

【0028】

【発明の効果】本発明により、限定された被移植片採取部位から、毛乳頭採取が行えるので、ドナーの苦痛を軽減でき、採取部位の異常を来すことがない。また、移植必要部位の大小にかかわらず、被移植部位の毛髪発毛に必要な数の毛乳頭スフェロイドを容易に製造し、移植し発毛させることができる。すなわち、採取部位の苦痛を最小限にとどめて、多面積の皮膚における発毛処置が可能となる。さらに、本発明の方法により、自家移植が容易になり、免疫学的拒絶反応の危険性を回避し、さらに、ウイルスをはじめとする病原性微生物の感染の回避が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】毛乳頭細胞スフェロイドを含む人工皮膚のHE染色像を示した図面に代わる写真(顕微鏡写真)であり、表皮層/真皮層境界部に毛乳頭細胞スフェロイドが組み込まれた像を示す。

【図2】毛包様構造体を含む人工皮膚のHE染色像を示す。に毛幹様の角化した領域が形成されていることを示す。
した図面に代わる写真（顕微鏡写真）であり、表皮層部

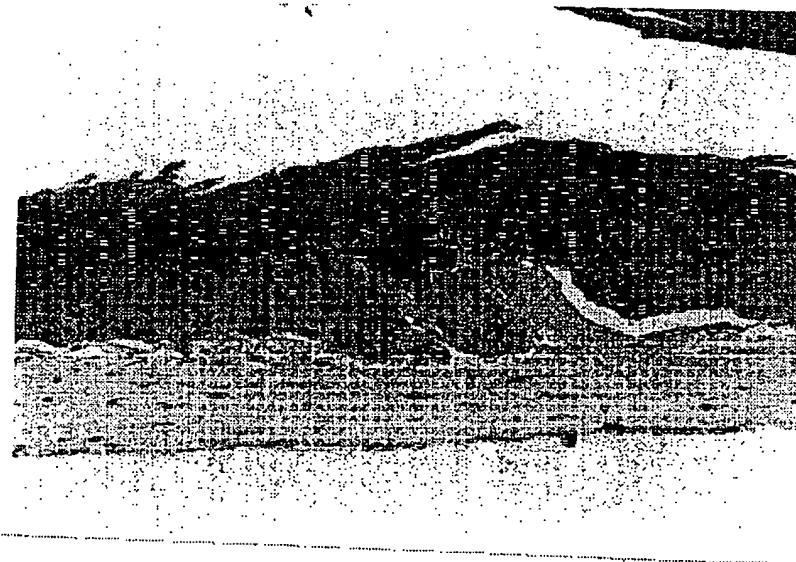
【図1】

図面代用写真



【図2】

図面代用写真



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.